

KONINKRIJK DER

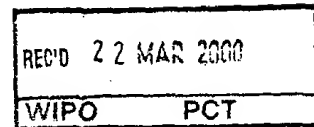


NEDERLANDEN

0 1. 03. 00

NL 99/805

Bureau voor de Industriële Eigendom



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 6 januari 1999 onder nummer 1010976,

ten name van:

**COÖPERATIEVE VERKOOP-EN PRODUCTIEVERENIGING VAN
AARDAPPELMEEL EN DERIVATEN AVEBE B.A.**

te Veendam

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Het scheiden en winnen van componenten uit planten",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk. 3 januari 2000.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze.

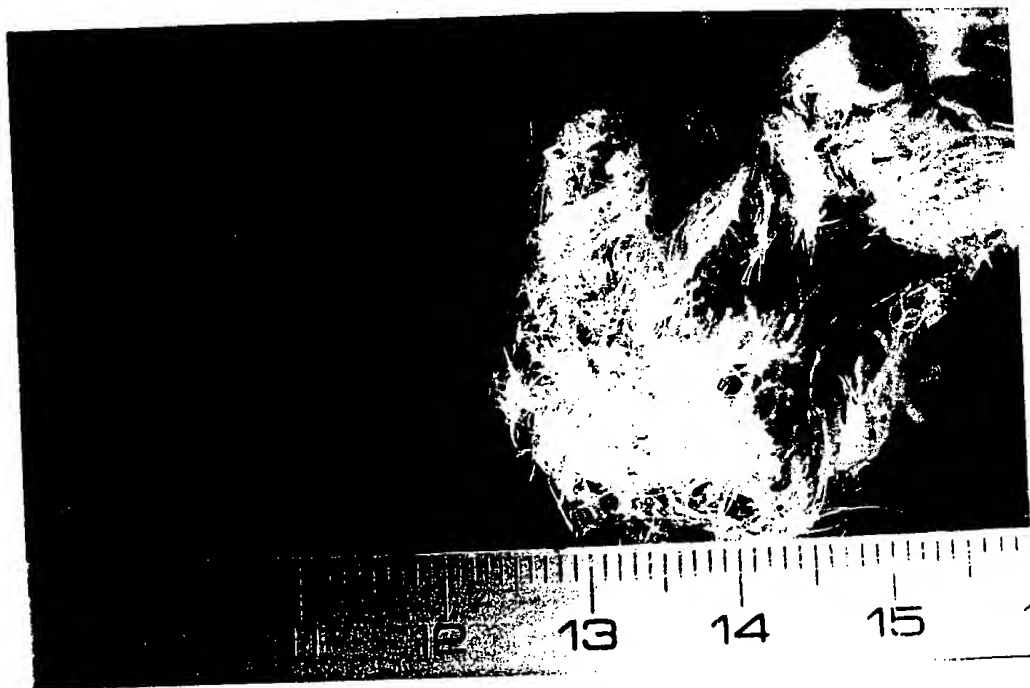
A. W. van der Kruk.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

UITTREKSEL

Titel: Het scheiden en winnen van componenten uit genetisch gemodificeerde planten.

De uitvinding heeft betrekking op het scheiden en winnen van componenten uit genetisch gemodificeerde planten. De uitvinding voorziet in een werkwijze voor het scheiden van componenten uit materiaal van een genetisch gemodificeerde plant met het kenmerk dat het materiaal op zijn minst ten dele vervezeld wordt en vervolgens zodanig wordt gescheiden in een vezelfractie en een sapstroom dat de vezelfractie voornamelijk relatief stevige weefsels zoals epidermis, sclerenchym en vaatbundels omvat en de sapstroom voornamelijk zachte weefsels zoals parenchym en cytosol bevat.



Titel: Het scheiden en winnen van componenten uit planten.

De uitvinding heeft betrekking op het scheiden en winnen van componenten uit planten.

Planten zijn, zoals de meeste organismen, opgebouwd uit cellen. Een plantencel bestaat uit een lipiden membraan
5 met een in het algemeen waterige inhoud, het cytosol, waarin de diverse celorganellen (eveneens omgeven door lipide membranen), zoals kern, mitochondriën, endoplasmatisch reticulum en chloroplasten, en het cytoskelet, opgebouwd uit microfilamenten en microtubuli,
10 dat de cel een innerlijke structuur geeft. Tevens zijn in de plantencel vacuolen aanwezig die een belangrijke rol spelen bij het op spanning houden van een plantencel, de vacuolen handhaven de turgor van de cel.

De samenstellende componenten van een plantencel zijn
15 ruwweg te onderscheiden in water, wat ruimschoots het grootste deel uitmaakt van een levende cel, componenten zoals zouten, (precursors van) lipiden, koolhydraten, aminozuren en nucleotiden, macromoleculen zoals zetmelen, eiwitten en nucleïnezuur en een veelvoud aan andere
20 moleculen, waaronder vitaminen en kleurstoffen zoals chlorofyl, caroteen en xanthofyl.

Een plantencel is in het algemeen omgeven door een celwand welke stevigheid en structuur geeft aan het plantenweefsel. De celwand is voornamelijk opgebouwd uit
25 (hemi)cellulose en andere koolhydraat-polymeren, welke zijn geaggregeerd tot vezelbundels. Houtige planten bevatten ook in ruime mate lignine, een polymeer samengesteld uit phenolen en andere aromatische monomeren.

Plantenweefsel is samengesteld uit plantencellen welke
30 alle, wanneer levend, in principe aan de bovenstaande omschrijving voldoen. Een belangrijk onderscheid kan worden

gemaakt tussen relatief stevige weefsels welke vrijwel geen, en de relatief zachte weefsels welke in het algemeen wel chloroplast of andere plastiden bevattende cellen omvatten. Weefsels welke in het algemeen geen chloroplast

5 houdende cellen omvatten zijn bijvoorbeeld de epidermis of huidweefsel van een plant, het kollenchym en sclerenchym of steunweefsel van een plant en de vaatvezelbundels of het vaatbundelweefsel, omvattende de belangrijke transportvaten (houtvaten en zeefvaten) in de plant. Wanneer een deel van

10 een plant sterk verhout is sterft in het algemeen op den duur het merendeel van de cellen in het verhoutte deel af en blijven slechts restanten van de cel inhoud over. Met name de cytosol en de daarin aanwezige organellen gaan verloren maar de vaatvezelbundels, huid en steunweefsels geven in

15 het algemeen vorm en structuur aan de plant en blijven in het algemeen aanwezig als de plant dood is. Kenmerkend is dat deze relatief stevige weefsels (met name vaatbundels, sclerenchym en epidermis) geen tot vrijwel geen chloroplast houdende cellen omvatten, terwijl een belangrijk deel

20 (tenminste in de bovengrondse blad en stengeldelen van de plant) van de relatief zachte weefsels, ook wel chlorenchym genoemd, uit voornamelijk alleen chloroplasthoudende parenchymale cellen is opgebouwd; hier vindt dan ook de fotosynthese plaats. Niet chloroplast houdend parenchym

25 (zoals bijvoorbeeld kan worden gevonden in vruchten, zaden, wortels en knollen van de plant, maar ook in ondergrondse blad en/of stengeldelen) is voornamelijk betrokken bij de opslag van nutriënten, water of gassen. Dergelijke opslag geschiedt met name in celorganellen verwant aan de

30 chloroplasten, in het algemeen (pro)plastiden genoemd, zoals in amyloplasten (opslag en productie van koolhydraten) elaioplasten (lipiden) en chromoplasten (kleurstoffen).

Genetische manipulatie of modificatie van planten is het veranderen van overdraagbare eigenschappen of kenmerken van een plant middels moderne recombinante of biotechnologische technieken. De techniek van genetische manipulatie is halverwege de jaren 80 op experimenteel niveau ontwikkeld bij planten. Aan het begin van de jaren 90 leidde dit tot de eerste handelsklare producten. Op dit moment wordt de techniek voornamelijk toegepast op bacteriën, schimmels en planten. Er bestaan echter ook mogelijkheden bij dieren. De technieken bij dieren zijn op dit moment nog niet optimaal of niet rendabel, en brengen voor de hoger ontwikkelde dieren op ethisch vlak problemen met zich mee.

Overdraagbare eigenschappen zijn min-of-meer eenvoudige eigenschappen, door een gen gecodeerd voor een bepaalde locus. Een genetisch gemodificeerde plant (of transgene plant) is een levend organisme waarnaar door middel van genetische-manipulatietechnieken (DNA recombinatie) een gen met bepaalde eigenschappen, dat in een donororganisme is geïdentificeerd, wordt overgebracht. Ook is het mogelijk een plant zodanig genetisch te modificeren dat deze een bepaald, van oudsher in die plant aanwezig gen, niet meer kan activeren of tot expressie brengen, het betreffende gen is dan uitgeschakeld. De transgene of gemodificeerde plant komt door het overgedragen of uitgeschakelde gen in het bezit van een nieuwe eigenschap of ander kenmerk, op hun beurt overdraagbaar op het nageslacht. Het overdragen of uitschakelen van genen kan worden uitgevoerd door het gebruik van bijvoorbeeld een bacterie als *Agrobacterium tumefaciens*, die door middel van plasmiden genetisch materiaal over kan dragen op een plantencel. De genen worden vervolgens opgenomen in het genoom van de geïnfecteerde cel. Er kan ook gekozen worden voor andere

manieren van modificatie, zoals het bombarderen van een plantencel met kogeltjes die omwikkeld zijn met DNA-fragmenten waarin het over te dragen gen zich bevindt.

De toepassing van de moderne biotechnologie in de landbouw biedt nieuwe mogelijkheden waarbij op het eerste gezicht bepaalde opbrengsten gegarandeerd zijn en minder fyto-sanitaire producten ingezet moeten worden in de strijd tegen plagen en ziekten, en tevens kwalitatief hoogstaande producten verkregen worden. Schattingen uit 1998 tonen aan dat wereldwijd op een oppervlakte van 30 miljoen hectare transgene planten worden verbouwd (tegen 14 miljoen hectare in 1997). Dit gebeurt voornamelijk in de Verenigde Staten (88%), Zuid-Amerika (katoen in Argentinië) (6%) en Japan (6%). Cijfers over de met transgene gewassen bebouwde oppervlakte in China zijn niet bekend, maar het gaat waarschijnlijk om een aanzienlijk percentage.

Naast de door genetische manipulatie verbeterde variëteiten die momenteel op de markt zijn - een twaalfstal voedings- en non-foodgewassen - is er snelle en reusachtige vooruitgang te verwachten in het onderzoek op dit gebied, ook al bevindt het merendeel van de toepassingen zich nu nog in een experimenteel stadium. Mogelijke verbeteringen zijn van zeer groot belang, met name bij de teelt van voedingsgewassen. Bovendien moet worden gewezen op de te verwachten ontwikkeling van genetisch gemodificeerde planten voor producten in de non-foodsector, die een zeer interessante bron van diversifiëring voor de landbouw vormen.

In principe zijn een tweetal typen genetische modificaties denkbaar. Een eerste type behelst het introduceren van nieuwe eigenschappen of kenmerken welke bevorderlijk of behulpzaam zijn voor de teelt of kweek van het betreffende gewas. Te denken valt aan het introduceren van droogte of koude resistentie zodat het gewas ook in

andere gebieden dan waar het oorspronkelijk gedijsde geteeld kan worden. Ook het introduceren van resistentie of tolerantie tegen herbiciden, zodat de onkruidbestrijding rond het gewas uitgevoerd kan worden met het betreffende herbicide zonder dat het gemodificeerde of recombinante gewas daar noemenswaardige schade van ondervindt, of het introduceren van resistentie tegen ziekten of plagen, behelst het introduceren van nieuwe eigenschappen of kenmerken welke bevorderlijk of behulpzaam zijn voor de teelt of kweek van het betreffende gewas.

Een tweede type behelst het introduceren of uitschakelen van genen waardoor het betreffende gewas een in potentie hoogwaardiger (recombinant) eindproduct kan leveren. Te denken valt hierbij bijvoorbeeld aan smaakverbetering of betere houdbaarheid van producten. Echter, een belangrijker toepassing is het verhogen of verrijken van de plant met waardevolle componenten of inhoudsstoffen. Verhoging van het vitamine gehalte van een plant middels genetische modificatie; verhoging en of verrijking van het eiwit of aminozuur gehalte, waarbij hoogwaardige eiwitten of aminozuren preferentieel door de plant worden geproduceerd middels genetische modificatie; het verbeteren van het evenwicht tussen verzadigde en onverzadigde vetzuren middels genetische modificatie zijn allen voorbeelden van in het verschiets liggende mogelijkheden van genetische modificatie bij planten.

Ook zijn nieuwe productiemogelijkheden voor zeer specifieke samenstellingen reeds voorzien. Met name de productie van vaccins (gebaseerd op planten die recombinante eiwitten of peptiden tot expressie brengen), van antibiotica (gebaseerd op planten welke voorzien zijn van recombinante enzymen of enzym systemen die deze antibiotica kunnen produceren), en van andere voor de humane of diergeneeskunde belangrijke factoren

(hemoglobine, insuline, stollingsfactoren, groeihormoon, humane of dierlijke (verterings)enzymen, en wat dies meer zij) zijn toepassingen van het introduceren of uitschakelen van genen waardoor het betreffende gewas een in potentie
5 hoogwaardiger (recombinant) eindproduct kan leveren.

De huidige toepassingen van het introduceren van nieuwe eigenschappen of kenmerken welke bevorderlijk of behulpzaam zijn voor de teelt of kweek van het betreffende gewas, zoals op het terrein van de tolerantie tegen
10 herbiciden, zijn het verst gevorderd. Ze zijn veelbelovend voor de landbouwproductie, de beheersing van de productiekosten en ten aanzien van de gevolgen van de landbouwactiviteit voor het milieu. Door middel van transgenese verkregen resistentie van planten tegen ziekten
15 biedt duidelijke voordelen voor de teelt of kweek van de betreffende plant: er bestaan met name zeer weinig of in sommige gevallen zelfs geen conventionele middelen ter bestrijding van bacteriën en virussen. Bij inherente resistentie van een plant kunnen behandelingen in bijna
20 alle gevallen achterwege blijven, en het effect op de opbrengst ligt dan beduidend hoger dan bij behandeling.

Echter, in het geval van het introduceren of uitschakelen van genen waardoor het betreffende gewas een in potentie hoogwaardiger (recombinant) eindproduct kan
25 leveren zijn ook nog problemen van een andere orde te overwinnen. Essentiële vragen met betrekking tot de winbaarheid van het gewenste product zijn bijvoorbeeld: hoe wordt het hoogwaardige product gewonnen, hoe scheidt ik de hoogwaardige (recombinante) component van het andere
30 plantaardig materiaal, moet de te winnen component in bepaalde, gemakkelijk te oogsten delen (zaden, vruchten, knollen etc), van de plant aanwezig zijn (waarbij hoge eisen worden gesteld aan de aard van de genetische modificatie, er moet niet alleen een gen gemodificeerd zijn

dat het betreffende product codeert, dit gen moet ook nog op de juiste plaats tot expressie worden gebracht) of moet de betreffende component uit alle delen van de plant worden gewonnen?

- 5 Met name voor eiwitproducten, voor relatief laagwaardige producten, voor producten welke in een relatief lage concentratie in de plant aanwezig zijn, en voor producten welke evenredig door de plant verdeeld zijn hebben de bestaande winningstechnologieën geen duidelijke
- 10 antwoorden. Het is sinds lang bekend diverse componenten uit plantaardige grondstoffen te winnen voor verder gebruik in bijvoorbeeld voedsel voor menselijke of dierlijke consumptie middels mechanische methoden. Vaak worden planten slechts verkleind of verhakseld om ze geschikt te
- 15 maken voor consumptie, een voorbeeld is het hakselen van maïs voor veevoer. Het is duidelijk dat hakselen echter niet bijdraagt aan een betere winning van een recombinante component welke relatief zuiver verkregen dient te worden.

- Met name de in de plantencel in het cytosol aanwezige
- 20 componenten zijn bij uitstek geschikt voor menselijke of dierlijke voeding aangezien deze bouwstoffen kunnen zijn voor overeenkomende componenten welke in dierlijke cellen aangetroffen worden. Daarom worden met name specifieke delen van een plant, zoals zaden, knollen, wortels of
- 25 vruchten welke specifiek rijk zijn aan bijvoorbeeld sap, suikers, eiwit, olie of zetmeel ook wel onderworpen aan verdergaande winningsmethoden, zoals persen of malen. Voorbeelden zijn het persen van olie uit olijven of oliehoudende zaden, het winnen van eiwit uit sojabonen of
- 30 het vermalen van aardappels of graankorrels tot meel. Een ander bekend voorbeeld is het persen van sap uit vruchten zoals druiven, voor directe consumptie of voor verdere verwerking. Bij druivensap gaat het voornamelijk om het

water, de suikers en de kleur- en smaakstoffen en om de verdere omzetting tot wijn.

Een voorbeeld van een winning van een plantaardige gronstof waar geen persmethode wordt toegepast is de
 5 winning van suiker uit bijvoorbeeld suikerbieten. Bieten worden in het algemeen versneden tot smalle reepjes (ook wel cossettes of frietjes genoemd) waarna de cossettes in een diffusietoren met heet water worden doorgespoeld. Gedurende dit diffusieproces diffundeert de suiker uit de
 10 bieten cellen. De suiker komt relatief eenvoudig vrij uit reeds beschadigde cellen, maar moet middels osmose en/of dialyse vrijkomen uit de intacte bietencel, waarvan er natuurlijk veel meer aanwezig zijn. Deze osmose en dialyse kan alleen renderend geschieden wanneer de temperatuur
 15 gedurende het hele proces nauwkeurig wordt gereguleerd, op bijvoorbeeld 72° C, en bij gebruik van voldoende grote hoeveelheden water. Er kan worden gesteld dat per ton suikerbiet minstens 1100 liter water nodig is. Middels een tegenstroom principe wordt het suikerrijke water gescheiden
 20 van de natte cossettes (nu pulp geheten). De natte pulp wordt gedroogd, en het suikerwater wordt (eventueel na filtratie, carbonatie en andere voorbehandelingen) ingedampt. Het drogen van de pulp en het indampen van het suikerrijke water tot diksap, ook wel serum geheten,
 25 vraagt veel energie.

Mechanische verwerking wordt van oudsher ook toegepast op voedergewassen, zoals gras, lucerne en andere vers en groen geoogste planten welke vaak als vrijwel gehele plant, en met name de blad- en/of stengeldelen en meestal
 30 behoudens de wortels, worden gebruikt voor het winnen van bijvoorbeeld (dier)voedselcomponenten. Dergelijke plantaardige grondstoffen worden in het algemeen middels persen van (bijvoorkeur gehakseld of anderszins verkleind) blad en/of stengel materiaal gewonnen, waarbij een deel van

het plantaardig materiaal als perssap verkregen wordt terwijl het overblijvende en geperste materiaal als perskoek bekend staat. Deze technieken staan ook tot de beschikking wanneer het materiaal van genetisch gemodificeerde planten afkomstig zou zijn.

Echter, de door het persen uitgeoefende drukkrachten resulteren in het algemeen in het slechts gedeeltelijk ontsluiten (knappen of barsten) van plantencellen in het materiaal, waardoor slechts een gedeelte van de waterige maar voedselcomponentrijke cytosol, eventueel met resten van de organellen en het de cel omgevende lipiden membraan, als perssap uit de cel vrijkomt. Het rendement van een dergelijke methode is dus laag. Perssap wordt in het algemeen verder behandeld, bijvoorbeeld middels zeven, waarna bijvoorbeeld het eiwit in het sap gewonnen wordt middels coagulatie door bijvoorbeeld zuur- en/of hittebehandeling. Ook kan perssap verder worden bewerkt middels (ultra- of membraan)filtratie, drogen, fermentatie of andere aan de vakman bekende methoden. Eiwitrijke of anderszins hoogwaardige voedingsstoffen voor menselijke en dierlijke consumptie, maar ook kleurstoffen zoals caroteen (pro-vitamine A), kunnen op deze manier slechts met laag rendement uit cytosol worden gewonnen.

De resulterende, relatief droge perskoek wordt in het algemeen als minder voedselrijk beschouwd, deze bevat relatief intacte vezelbundels samengesteld uit (niet direkt) verteerbare cellulose vezels, aanhangend perssap en resterende plantencellen welke niet onder invloed van het persen zijn ontsloten. Vooral deze resterende plantencellen met niet gewonnen cytosol geven nog voederwaarde aan de perskoek, die in het algemeen wordt gedroogd en, al dan niet gepelletiseerd, gebruikt als (ruwvoer) component in diervoeders, met name voor herkauwers.

Voor het mechanisch omsluiten van bijvoorbeeld grassen wordt traditioneel een werkwijze toegepast gebaseerd op het desintegreren van de plantaardige grondstof met behulp van hamermolens gevolgd door het uitpersen van de

5 gedesintegreerde grondstof (hier aangeduid als pulp) met behulp van schroefpersen of bandpersen. Hierbij wordt de pulp gescheiden in een fractie perskoek en een fractie perssap. De sapfractie wordt beschouwd als de fractie waarin zich de industrieel winbare inhoudstoffen uit het

10 plantenmateriaal bevinden. Hamermolens bestaan in de regel uit een rotor waaraan zich vaste of vrij beweeglijke elementen bevinden die bij het ronddraaien van de rotor in contact worden gebracht met de plantaardige grondstof en deze middels slagkracht desintegreren. Het desintegrerende

15 effect van hamermolens is relatief groot wanneer het plantaardige materiaal een goede turgor bezit, d.w.z. wanneer de plantencellen onder druk staan. In dat geval zorgt de slagkracht ervoor dat het weefsel kapot springt en de celinhoudbestanddelen met het weefselvocht vrijgemaakt

20 worden. Is de turgor gering dan zal het plantenmateriaal door er op te slaan ingedrukt worden. Het weefsel blijft daarbij min of meer intact en het resultaat is dat de celinhoud in veel mindere mate beschikbaar komt. Dit heeft grote gevolgen voor de winbaarheid van met name die

25 celinhoudbestanddelen die slechts ten dele in opgeloste vorm in de plantaardige biomassa aanwezig zijn en voor een ander deel in de vorm van vaste, onopgeloste stof. Dit geldt o.a. voor plantaardige eiwitten, maar ook voor lipiden en pigmenten, en het valt te begrijpen dat dit voor

30 recombinante producten niet anders zal zijn.

Bij de boven beschreven persmethodes van plantaardig materiaal bevat is het in het algemeen van belang dat het materiaal zo vers mogelijk, kort na de oogst, wordt bewerkt. Alleen dan staan de plantencellen voldoende onder

spanning om onder druk te kunnen barsten of knappen zodat de cytosol vrijkomt. Plantendelen welke op het moment van persen al enige tijd geleden zijn geoogst zijn al enigszins uitgedroogd, de aanwezige plantencellen hebben een groot
 5 deel van de noodzakelijke turgor verloren en zijn te slap om nog onder druk te kunnen barsten of knappen. In niet vers materiaal zal de winning van perssap dus met nog minder rendement verlopen. Hetzelfde geldt voor materiaal afkomstig van planten die al voordat zij werden geoogst een
 10 groot deel van de turgor in hun planten cellen hebben verloren door uitdroging en/of rijping. In het algemeen zijn dergelijke planten niet meer (volledig) groen maar krijgen zij bruine of gele aspecten. Verhoute plantendelen komen in het geheel niet in aanmerking voor bovenstaande
 15 methoden aangezien hierin de meeste cellen afgestorven zijn, of in ieder geval een slechts zeer geringe cytosol fractie bevatten en dus geen bijdrage leveren aan de winning van hoogwaardig voedsel.

In het algemeen wordt plantenmateriaal gescheiden in
 20 een (pers)koek- (pulp) en een (pers)sap-fractie (diksap). Kenmerk van deze werkwijze is de slechts gedeeltelijke onttrekking (met het perssap) van de celinhoudbestanddelen (vacuole-inhoud en cytoplasma met daarin aanwezige celorganellen zoals chloroplasten en celkernen); de
 25 celwanden blijven nagenoeg volledig achter in de perskoek tezamen met het overige deel van de celinhoud. In de perskoek bevinden zich alle weefsels die ook in de grondstof zitten, daarnaast ook een deel van de celinhoud. De kleur van de verse perskoek is overwegend groen of geel
 30 doordat de chloroplasten met daarin het aanwezige chlorofyl (bladgroen) met het perssap slechts ten dele verwijderd zijn. Het plantenmateriaal is slechts ten dele tot op weefsel niveau gedesintegreerd; dat betekent dat nog herkenbare fragmenten van bladeren en stengels aanwezig

zijn naast individuele weefsels zoals geïsoleerde vaatbundels.

Het perssap bestaat in hoofdzaak uit de waterige inhoud van cellen: de vacuole-inhoud en het cytoplasma met
5 daarin celorganellen zoals chloroplasten in intacte of gedesintegreerde vorm; celwandbestanddelen zijn nagenoeg afwezig doordat ze in de perskoek achterblijven.

De winbaarheid van eiwit en andere gedeeltelijk oplosbare stoffen is daardoor bij de traditionele werkwijze
10 van fractioneren erg gevoelig voor variaties in de aard van de plantaardige biomassa, m.n. de aanwezigheid van turgor die zich in de regel vertaalt in verschillen in drogestofgehalte.

De traditionele werkwijze van fractioneren heeft tot
15 gevolg dat bij uitpersen van de pulp slechts een deel van de celinhoudbestanddelen in de sapstroom terechtkomt en een ander deel achterblijft in de perskoek. De perskoek bevat dus nog, naast het merendeel van de celwanden, ook nog een deel van de celinhoudbestanddelen en wordt daardoor
20 gebruikt als veevoeder.

De bestaande persmethodes om uit plantaardig materiaal hoogwaardige van laagwaardige componenten te scheiden zijn dus relatief sterk afhankelijk van de turgor van de in het plantaardig materiaal aanwezige cellen wat het toepassen
25 van deze methodes beperkt tot het toepassen op relatief vers en groen materiaal. De bestaande methodes zijn dus niet erg geschikt om hoogwaardige componenten met rendement uit genetisch gemodificeerde planten te winnen. De resulterende perskoek bevat, ook met gebruik van vers en/of
30 groen materiaal, vaak nog grote hoeveelheden onontsloten plantencellen met daarin hoogwaardige cytosol terwijl slechts een geringe prijs voor perskoek verkregen zal kunnen worden daar deze eigenlijk alleen geschikt is als relatief laagwaardige component van diervoeder. De

bestaande klassieke werkwijzen zouden in principe ook toepasbaar zijn op genetisch gemodificeerde planten welke specifiek dusdanig zijn gemodificeerd dat juist hun delen zoals zaden, knollen, wortels of vruchten rijk zijn aan

5 bijvoorbeeld de gewenste recombinante eiwitten, peptiden, aminozuren, oliën en koolhydraten. Echter, traditionele persmethoden, zoals bijvoorbeeld bekend bij grassen, zijn niet in staat tot complete scheiding van sap en vezel fracties. Ook een diffusie proces, zoals beschreven bij de

10 verwerking van suikerbieten, heeft grote nadelen, het vraagt dermate veel water en energie dat het terugwinnen van de gewenste grondstof, zoal dat al mogelijk zou zijn erg duur zou worden. Met name nu genetisch gemodificeerde suikerbieten, en andere knol- en/of wortel planten, als

15 gewas steeds vaker zullen worden geteeld is behoefte aan betere winnings methoden, welke dan ook kunnen worden toegepast bij ongemodificeerde gewassen. Tevens, specifieke lokalisatie van de te winnen component vergt meer dan het modificeren van een gen alleen, het zal dan in de meeste

20 gevallen nodig zijn de plant zodanig te modificeren dat deze het gewenste product niet alleen produceert, maar ook de gemodificeerde systemen bezit om de gewenste producten in die specifieke delen op te slaan. De moleculair biologische kennis van de systemen welke betrokken zijn bij

25 de opslag is vooralsnog in het algemeen niet toereikend om ook de opslag van het product zodanig te manipuleren dat het gewenste resultaat bereikt wordt. Weefsel specifieke expressie van recombinante genen staat nog in de kinderschoenen. In het algemeen kan worden verwacht dat het

30 gewenste product ook, en voornamelijk, te vinden zal zijn in de blad- en/of stengeldelen van de gemodificeerde plant.

Voor het winnen van hoogwaardige componenten uit genetisch gemodificeerde en ongemodificeerde planten, zoals bijvoorbeeld uit blad- en/of stengeldelen, wortels of

knollen is behoefte aan betere methoden die met een hoger rendement dan de bestaande methoden de plantencel kunnen ontsluiten, de cytosolfractie meer beschikbaar kan maken voor winning en betere afzetmogelijkheden biedt voor het
5 vezelhoudend restmateriaal. De uitvinding beoogt in deze behoefte te voorzien.

De uitvinding voorziet in een werkwijze voor het scheiden van componenten uit materiaal van een plant met
10 het kenmerk dat het materiaal op zijn minst ten dele vervezeld wordt en vervolgens zodanig wordt gescheiden in een vezelfractie en een sapstroom dat de vezelfractie voornamelijk relatief stevige weefsels zoals epidermis, sclerenchym en vaatbundels omvat en de sapstroom
15 voornamelijk zachte weefsels zoals parenchym en cytosol bevat. In een voorkeursuitvoering voorziet de uitvinding in een methode tot scheiding van een sapstroom die met name chloroplasten omvat, echter, ook dat parenchym dat met name andere plastiden, zoals amyloplasten, elaioplasten en
20 chromoplasten omvat is eenvoudig te scheiden van de vezelfractie. De uitvinding voorziet in een nieuwe werkwijze van fractioneren, die bestaat uit tenminste twee stappen: een eerste stap waarin het plantaardige materiaal door middel van de inwerking van afschuifkrachten vervezeld
25 wordt en een tweede stap waarin de vezelfractie afgescheiden wordt van de rest.

De werkwijze volgens de uitvinding is toepasbaar op alle vezelhoudende plantaardige materialen, zowel afkomstig van geteelde planten (cultuurgewassen) als van wilde
30 planten.

Een werkwijze volgens de uitvinding is zowel van toepassing op wel of niet genetisch gemodificeerd plantaardig materiaal dat voornamelijk blad- en/of stengeldelen omvat, zoals plantaardige biomassa afkomstig van cultuurgrasland,

voedergewassen zoals voedergrassen en maïs, luzerne, klaver, en andere vlinderbloemigen, vezelgewassen zoals vlas en hennep, en het loof van gewassen welke normaliter alleen voor hun zaden, vruchten of knollen geteeld worden

5 zoals granen, bieten, erwten, bonen, aardappels, wortelen, cassave, bataat. De werkwijze van de uitvinding is ook van toepassing op het verwerken van conventionele zaden, vruchten of knollen zoals granen, suikerbieten, topinamboer, bieten, erwten, bonen, aardappels, wortelen,

10 cassave, bataat, en op genetisch gemodificeerde planten welke specifiek dusdanig zijn gemodificeerd dat juist hun delen zoals zaden, knollen, wortels of vruchten rijk zijn aan bijvoorbeeld de gewenste recombinante eiwitten, peptiden, aminozuren, oliën en koolhydraten.

15 Fractioneren van plantaardige biomassa betekent het scheiden in een aantal fracties. Door biomassa te fractioneren ontstaan nieuwe productstromen met andere toepassingsmogelijkheden dan de grondstof zelf. Deze nieuwe productstromen vertegenwoordigen daardoor vaak tezamen meer

20 waarde dan de oorspronkelijke biomassa. De uitvinding voorziet in een nieuwe techniek die is gebaseerd op het vervezelen en vervolgens ontvezelen van plantaardige biomassa.

In een voorkeursuitvoëring voorziet de uitvinding in

25 een werkwijze tot scheiding van componenten uit plantaardig materiaal met het kenmerk dat het materiaal op zijn minst ten dele mechanisch vervezeld wordt en vervolgens wordt gescheiden in een vezelfractie en een sapstroom, waarbij de vezelfractie (zie bijvoorbeeld figuur 1 en 2, ook voor een

30 vergelijking met een traditionele methode) voornamelijk relatief stevige weefsels zoals epidermis, sclerenchym en vaatbundels omvat en de sapstroom (zie bijvoorbeeld figuur 6 en 7, ook voor een vergelijking met een traditionele methode) voornamelijk zachte weefsels zoals parenchym en

cytosol bevat. De mechanische vervezeling wordt bijvoorbeeld bewerkstelligd middels behandeling van het materiaal in een blender. Bij voorkeur, zeker wanneer toepassing op industriële schaal is gewenst, geschiedt de

5 vervezeling volgens de uitvinding middels een inrichting zoals een (druk)refiner, met maalschijven, zoals toegepast in de pulp- en papierindustrie, of in een inrichting met gelijkwaardige werking waardoor het plantaardig materiaal kan worden vervezeld zodat het kan worden gescheiden in een

10 vezelfractie welke voornamelijk relatief stevige weefsels zoals epidermis, sclerenchym en vaatbundels omvat en de sapstroom voornamelijk zachte weefsels zoals parenchym en cytosol omvat. Bij het vervezelen wordt het vaatbundelweefsel met het sclerenchym en de epidermis

15 (tezamen de vezelfractie) mechanisch losgemaakt van het overige in hoofdzaak parenchymatische weefsel. Dit parenchymatische weefsel wordt tegelijkertijd ontsloten en de celinhoudbestanddelen (cytosol en parenchym) hieruit komen hierbij nagenoeg volledig beschikbaar. Het vervezelen

20 kan gebeuren met behulp van refiners zoals deze in de pulp- en papierindustrie in gebruik zijn voor het vervezelen van hout en houtpulp. Refinen c.q. vervezelen gebeurt in de regel onder toevoeging van vocht aan het plantenmateriaal. Het resultaat is dan een slurrie van vervezeld materiaal

25 waaruit de vezels verwijderd kunnen worden. De vezelfractie (vezelstroom) die aldus gewonnen wordt, is door zijn aard en samenstelling onder andere geschikt voor de volgende toepassingen: als grondstof voor papier en karton (massiefkarton, vouwkarton en vormkarton), als grondstof

30 voor de productie van vezelplaatmaterialen (zachtboard, hardboard, spaanplaat, MDF, HDF en MDF/HDF vormdelen) en composieten, als grondstof voor vochtabsorberende materialen, als luiers, maandverband etc., als grondstof voor de bereiding van groei media (potgrond en substraten),

mulchen (als bescherming tegen erosie, en als onkruid- en ziekteonderdrukker), als bodemverbeteraar of als brandstof.

- Bij het ontvezelen wordt de vrijgemaakte vezel bijvoorbeeld middels zeven afgescheiden van de overige plantenbestanddelen. Door wassen en zeven kan de vezel verder gezuiverd worden en kunnen zoveel mogelijk niet-vezelbestanddelen met het waswater alsnog gewonnen worden. De ontvezelde slurrie bestaat dan uit een mengsel van toegevoegd water, weefselvocht, celinhoudbestanddelen en
- 10 fijn gedispergeerde celwanden afkomstig uit het parenchymatisch weefsel. Uit de ontvezelde slurrie of sapstroom kunnen inhoudstoffen worden gewonnen in min of meer zuivere vorm zoals: (recombinante) eiwitten, peptiden en (hoogwaardige) aminozuren, vaccins, antibiotica of
- 15 andere in de geneeskunde belangrijke factoren, enzymen, pigmenten, lipiden, vetzuren, zetmelen, oplosbare suikers en (celwand)koolhydraten voor toepassing in de veevoeding, humane voeding, of als substraat voor fermentaties, of kunnen door concentratie (vee)voedingsproducten gemaakt
- 20 worden met een hoge voedingswaarde als gevolg de aanwezigheid van hoogwaardige eiwitten, peptiden, aminozuren of andere componenten en/of als gevolg van de verwijdering van de niet- of slecht verteerbare vezelfractie.
- 25 De ontvezelde slurrie kan in vervolgstappen verder gefractioneerd worden. Een mogelijkheid is bijvoorbeeld het afscheiden van alle vaste delen door middel van centrifugeren, al dan niet voorafgegaan door een coagulatiestap middels verhitting, aanzuring of op andere
- 30 wijze. Een andere mogelijkheid is de parenchymatische celwanden in oplosbare suikers om te zetten met behulp van celwandsplitsende enzymen (pectinases, cellulases etc.) en aldus toe te voegen aan de fractie opgeloste stof in de ontvezelde slurrie.

Kenmerk van de werkwijze zoals voorzien door de uitvinding is de splitsing op weefselniveau in een vezelfractie die de relatief stevige weefsels bevat (vaatbundels, sclerenchym en epidermis) én een ontvezelde fractie die de relatief zachte weefsels (parenchym) met hun inhoud bevat. Kort samengevat is het verschil tussen de traditionele en nieuwe werkwijze de onttrekking van weefselvocht (traditioneel) versus weefselfractionering (nieuwe werkwijze). De nieuwe werkwijze voorziet in het met een hoog rendement winnen van componenten uit planten, terwijl met een traditionele werkwijze grote hoeveelheden hoogwaardige component in bijvoorbeeld het uitgeperste materiaal achterblijven, of een erg hoge energie behoefte hebben.

Met name ook genetisch gemodificeerde cultuurgewassen, waarbij de plant zodanig is veranderd dat deze preferentieel een of meer componenten in bijvoorbeeld de cytosol of in een cel organel tot expressie brengt, komen in aanmerking tot verwerking volgens een werkwijze voorzien door de uitvinding. Ook bij genetisch gemodificeerde planten (en met name bij die waarbij de door de genetische manipulatie verkregen stapeling van een (recombinante) hoogwaardige component door meerdere delen van de plant is verspreid) is een goede ontsluiting van de plantencel en zijn inhoud van groot belang, zodat een product verkregen middels moderne biotechnologische manipulatie van een dergelijk cultuurgewas met het hoogst mogelijke rendement kan worden gewonnen. Toepassing van een werkwijze volgens de uitvinding maakt het bijvoorbeeld mogelijk ook genetisch gemodificeerde planten, waarbij de door de genetische modificatie in hoeveelheid toegenomen, of de de novo aanwezige component, zoals een vaccin, een antibioticum of een andere factor die in de (dier)geneeskunde belangrijk is, of (recombinante) hoogwaardige eiwitten, peptiden of

aminozuren, evenredig in het parenchym van alle blad-
stengel- en/of wortel- of knoldelen aanwezig is, met hoog
rendement te benutten, doordat vrijwel volledige winning
van de in het parenchym aanwezige plastiden, zoals
5 chlorolasten, amyloplasten, elaioplasten en chromoplasten
omvat, eenvoudig te scheiden is van de vezelfractie door
toepassen van een werkwijze volgens de uitvinding.

De uitvinding voorziet bijvoorbeeld ook in het
scheiden van componenten uit wortel- en/of knoldelen van
10 wel of niet genetisch gemodificeerde gewassen zoals
suikerbieten. Gewassen suiker bieten worden in een
uitvoering van een werkwijze volgens de uitvinding in
voorgehakselde of voorgesneden vorm gedoseerd in een
refiner. Tijdens deze processgang wordt het knolweefsel
15 vervezeld tot een pulp. Na de vervezeling stap wordt de
vezelfractie van de sapstroom gescheiden bijvoorbeeld
middels zeven, filtreren of centrifugeren, en wordt de
vaste fractie eventueel gewassen met water om de hierin nog
oplosbare componenten te winnen. De vloeibare fractie of
20 sapstroom kan na centrifugatie verder worden verwerkt tot
winning van de suikers op de wijze zoals gebruikelijk in de
suikerindustrie (carbonatie, indikking, kristallisatie,
centrifugatie, etc.) Door toepassing van de werkwijze
volgens de uitvinding is de gangbare diffusie stap niet
25 meer nodig. Niet 1100 liter water wordt gewonnen maar een
reeds hoog geconcentreerde sapstroom is het resultaat.
Behalve een directe kostenbesparing als gevolg van
eliminatie van de diffusie stap, zal ook de concentratie
van het suiker in het serum of sapstroom hoger zijn dan die
30 in stroom van de diffusie stap. Bovendien zal de eliminatie
van de diffusie stap een besparing betekenen van de totale
hoeveelheid benodigd water met een inherente besparing aan
verdampings en droogkosten. Door het volgen van een
werkwijze volgens de uitvinding zal het suikerverlies

(normaal circa 2%) sterk worden gereduceerd doordat de totale hoeveelheid aanwezige suiker in de biet in het serum blijft. Tevens is door de vervezeling de vezelfractie van de suikerbiet beter verteerbaar dan de conventionele pulp, 5 wanneer toegepast als ingrediënt van diervoeders. Ook voor genetisch gemodificeerde bieten, zoals bijvoorbeeld een bij bieten met verhoogd fructose-oligosaccharide gehalte of met verhoogde aminozuur synthese geschiedt de verwerking bij voorkeur zoals voorzien door de uitvinding.

10 De uitvinding voorziet ook in een inrichting voor het toepassen van een werkwijze volgens de uitvinding. Een dergelijke inrichting is gekenmerkt door middelen geschikt voor het vervezelen volgens de uitvinding waarbij het relatief stevige vaatbundelweefsel met bijvoorbeeld het 15 sclerenchym en de epidermis (tezamen de vezelfractie) mechanisch wordt losgemaakt van het overige in hoofdzaak parenchymatische weefsel. Dit parenchymatische weefsel wordt tegelijkertijd ontsloten en de celinhoudbestanddelen (cytosol en parenchym) hieruit komen hierbij nagenoeg 20 volledig beschikbaar. Met vervezeling wordt hier bedoeld dat het plantenmateriaal wordt blootgesteld aan dusdanige krachten dat de relatief stevige weefsels vrijwel geheel losgemaakt worden van de relatief zachte weefsels. Als resultante van de krachten welke deze vervezeling 25 bewerkstelligen zal het overgrote deel van de, zo niet vrijwel alle, plantencellen, worden ontsloten waardoor het cytosol vrijkomt. Deze cytosol laat zich als sapstroom, met daarin in het algemeen ook resten van de organellen en de cel omgevende lipiden membraan en parenchymatische 30 celwanden, relatief eenvoudig middels zeven, of andere aan de vakman bekende scheidingsmiddelen van de vezelcomponent scheiden.

Een eerste voordeel van de uitvinding is hierin gelegen dat het rendement van de werkwijze niet afhankelijk

is van de turgor van de in het materiaal aanwezige plantencellen, waardoor deze met groter rendement dan gebruikelijk in de bovenomschreven persmethoden ontsloten kunnen worden.

5 Een tweede voordeel van de uitvinding is hierin gelegen dat de uitvinding voorziet in twee productstromen welke op zich erg zuiver zijn. Een eerste, de vezelfractie bevat voornamelijk cellulose en hemicellulose, voornamelijk bestaande uit de elementen C, H en O (wat op zich voordelen
10 oplevert voor een schone verbranding), een tweede bevat alle waardevolle en gecompliceerde inhoudsstoffen, en bijvoorbeeld de recombinante component(en), die in het parenchym en cytosol te vinden zijn, en welke relatief eenvoudig verder kunnen worden gescheiden.

15 De twee productstromen zijn door bijvoorbeeld zeven van elkaar te scheiden. Andere scheidingsmethoden zijn ook denkbaar, b.v. centrifugeren, verwerken middels (hydro)cycloon en centrizeven, en decanteren of sedimenteren, of combinaties van deze methoden. Bij het
20 ontvezelen wordt de vrijgemaakte vezel middels bijvoorbeeld zeven afgescheiden van de overige plantenbestanddelen. Door wassen en zeven kan de vezel verder gezuiverd worden en kunnen zoveel mogelijk niet-vezelbestanddelen met het waswater als nog gewonnen worden. De ontvezelde slurrie
25 bestaat dan uit een mengsel van toegevoegd water, weefselvocht, celinhoudbestanddelen en fijn gedispergeerde celwanden afkomstig uit het parenchymatisch weefsel.

 Een eerste productstroom zoals voorzien door de uitvinding is een (in het algemeen hoogwaardige) sapstroom
30 bestaande uit een waterige oplossing/suspensie van nagenoeg alle hoogwaardige (recombinante) componenten of voedingsstoffen uit het plantaardig materiaal (zoals suikers, eiwitten, lipiden, pigmenten, en dergelijke). Door verwijdering van de (in nutritionele zin laagwaardige)

celwandvezelcomponenten ontstaat (op basis van droge stof) deze relatief hoogwaardige productstroom, waaruit de diverse componenten relatief eenvoudig verder kunnen worden geïsoleerd. Het ontvezelde product of de sapstroom bestaat

5 in hoofdzaak uit parenchym, deels als intacte cellen deels als gedesintegreerd celmateriaal. De kleur van het ontvezelde product is in de regel groen door de aanwezigheid van intacte of kapotte chloroplasten, soms bruingroen door bruinverkleuring tijdens het fractioneren.

10 Macroscopisch gezien is het een vloeistof. Microscopisch zijn in deze vloeistof voornamelijk intacte en gedesintegreerde parenchymcellen zichtbaar en celorganellen zoals chloroplasten.

De sapstroom van dergelijke genetisch gemodificeerde plantenmaterialen volgens de uitvinding wordt verder

15 behandeld, bijvoorbeeld middels zeven, waarna bijvoorbeeld het (recombinante) eiwit, peptiden, aminozuren, en andere (recombinante) componenten in het sap gewonnen wordt middels bijvoorbeeld coagulatie door bijvoorbeeld zuur-

20 en/of hitte-behandeling. Ook kan de sapstroom verder worden bewerkt middels (ultra- of membraan)filtratie, drogen, fermentatie of andere aan de vakman bekende methoden. Eiwitrijke of anderszins hoogwaardige voedingsstoffen voor menselijke en dierlijke consumptie, maar ook kleurstoffen

25 zoals caroteen (pro-vitamine A), en specifiek recombinante producten kunnen op deze manier uit cytosol, ook uit dat van blad- en/of stengeldelen worden gewonnen.

De tweede productstroom, de vezelfractie zoals voorzien door de uitvinding bestaat uit de relatief harde

30 weefsels. Dit zijn in de regel de vaatbundels, het sclerenchym en de epidermis. De celinhoud is in deze weefsels afwezig of wordt tijdens het fractioneren en wassen nagenoeg geheel verwijderd. Vezel bestaat daardoor overwegend uit celwandcomponenten. Chloroplasten zijn in

een zuiver vezelpreparaat nagenoeg afwezig. De kleur van de gewassen vezel varieert in de regel van wit tot geel of lichtbruin. Soms kan een lichtgroene kleur ontstaan door impregnatie met chlorofyl tijdens de winning. Macroscopisch
 5 gezien heeft de vezelfractie een vezelstructuur voornamelijk door het draadvormige karakter van de vaatbundels. Microscopisch gezien zijn naast de draadvormige structuren van vaatbundels en sclerenchym in de regel ook stukken epidermis weefsel herkenbaar bestaande
 10 uit vellen van één cel laag dik. De vaatbundels zijn opgebouwd uit meerdere cellen waaronder houtvaten en zeefvaten. Afhankelijk van de mate van vervezeling komen ook vezels bestaande uit één cel voor en voorts de restanten van celwanden en (spiraal-, net- of ringvormige)
 15 celwandverdikkingen. Typerend voor de epidermis-vellen is de aanwezigheid van huidmondjes en kiezelzuurtandjes of haren.

De vezelstroom zoals voorzien door de uitvinding bestaat nagenoeg uitsluitend uit een natte vaste
 20 vezelstroom (hoofdzakelijk cellulose en hemi-cellulose) met in principe geen nutritionele waarde aangezien deze fractie niet direct, en slechts gering microbiologisch verteerbaar is. Echter, het ontbreken van verteerbaarheid maakt het gebruik van de vezelsstroom voor niet-voedsel toepassingen
 25 mogelijk, dit in tegenstelling tot bijvoorbeeld de perskoek afkomstig uit bovenomschreven traditionele persmethoden waar de perskoek eigenlijk alleen geschikt is voor voedertoepassingen en spoedig zou verrotten als deze niet tot voedsel werd bereid en gegeten werd.

30 Bijvoorbeeld, de uitvinding voorziet in het gebruik van een vezelfractie voor de productie van energie. De vezelfractie bevat voornamelijk de koolhydraten cellulose en hemicellulose (samengesteld uit voornamelijk de elementen C, H en O), welke uitstekend brandbaar zijn en

dus met hoog rendement kunnen worden omgezet in bruikbare
 energie in bijvoorbeeld een warmte-kracht centrale en
 waarvan bij verbranding geen of slechts geringe uitstoot
 van schadelijke stoffen te verwachten valt. Het verwerken
 5 van plantenmateriaal volgens een werkwijze als voorzien
 door de uitvinding, gevolgd door het gebruiken van de
 resulterende vezelfractie als brandstof, zal bijdragen aan
 het verminderen van de CO₂-uitstoot aangezien het hier een
 niet fossiele brandstof betreft. Tevens zal de verbranding
 10 van de vezelfractie op zich schoner zijn voor het milieu
 daar de vezelfractie niet of nauwelijks verontreinigd is
 met de normaal in droog planten materiaal voorkomende
 zoutresiduen (zoals K, Na, Cl, P verbindingen) en
 eiwitresten (met daarin ook S en N verbindingen). Deze
 15 zoutresiduen en eiwitresten, afkomstig uit het cytosol zijn
 met de sapstroom, gescheiden van de vezelfractie.
 Verbranding van de vezelfractie (met daarin voornamelijk C,
 H en O verbindingen welke door verbranding omgezet worden
 in H₂O en CO₂) zal dus een veel kleinere milieubelasting
 20 met zich meebrengen dan verbranding van ander
 plantenmateriaal waarin al deze zoutresiduen en eiwitresten
 nog aanwezig zijn. Eiwitverbranding draagt met name bij aan
 de uitstoot van zwavel en stikstof verbindingen zoals
 zwavel en stikstof oxiden, onbrandbare zoutresiduen zullen
 25 bijdragen aan het rest-as volume, bij de verbranding van
 een vezelfractie volgens de uitvinding zal de uitstoot van
 bijvoorbeeld zwavel en stikstof oxiden, en het rest-as
 volume met daarin de zoutresten veel kleiner zijn.

Aangezien het vezelmateriaal van organische herkomst
 30 is is het bijvoorbeeld ook als turfvervanger in
 bijvoorbeeld potgrond of in tuinbouwteeltsubstraten
 toepasbaar.

In een voorkeursuitvoering van de uitvinding wordt het
 plantenmateriaal dermate sterk vervezeld, totdat

bijvoorbeeld het vezelmateriaal voornamelijk uit elementair vezels bestaat, zodat de zo ontstane vezelcomponent of vezelstroom bijvoorbeeld geschikt is voor verdere verwerking tot karton- en/of papier, of kan worden gebruikt
 5 als (natuurlijke) vezel in composieten tezamen met en ter versterking van (kunst)harsen.

Voorbeelden van plantaardig materiaal dat behandeld kan worden met een werkwijze volgens de uitvinding zijn genetisch gemodificeerde (voeder)gewassen zoals grassen
 10 (granen zoals tarwe, rogge en mais inbegrepen), luzerne, maar ook oogstresiduen van gewassen waar van normalerwijze de blad-en/of stengel delen niet worden verwerkt, zoals aardappel of (suiker)bietenloof wat in het algemeen bij de oogst op het land achterblijft. Het hoge rendement van een
 15 werkwijze volgens de uitvinding maakt het bewerking van dergelijke plantaardige materialen rendabel.

De uitvinding voorziet tevens in een werkwijze tot scheiding van componenten uit plantaardig materiaal waarbij het betreffende materiaal relatief lang geleden is geoogst
 20 en al, tenminste al ten dele, is uitgedroogd, of waarbij het plantaardig materiaal niet meer als vers en groen is te omschrijven, maar bijvoorbeeld door rijping een meer houtig en/of droog karakter heeft verkregen. Dergelijke materiaal is voor het verwerken in een persmethode niet geschikt,
 25 maar is nu uitstekend verwerkbaar, aangezien de mate van turgor van de te ontsluiten plantencel bij toepassen van een werkwijze volgens de uitvinding niet belangrijk is. De uitvinding voorziet in een refiner, of een inrichting met vergelijkbare werking, en het gebruik van een
 30 dergelijke inrichting, bijvoorbeeld voor het scheiden van componenten uit plantaardig materiaal dat (nog) geen of slechts een geringe verhouting vertoont en waarin parenchym aanwezig is. Dit parenchym met de daarin aanwezige cytosol is de basis van de sapstroom zoals voorzien door de

uitvinding. Een refiner wordt in het algemeen gebruikt om hout snippers af te breken tot vezels met het doel pulp te maken voor de productie van papier en/of karton. De uitvinding voorziet in het verwerken middels een refiner van een genetisch gemodificeerd gewas. Refiners worden in het algemeen niet voor vers en/of groen materiaal gebruikt, aangezien hout voornamelijk uit dood of verhout weefsel bestaat waar het meeste parenchym, met chloroplasten, uit verdwenen is. Verschillende typen refiners zijn bekend aan de vakman, er zijn bijvoorbeeld refiners met conische schijven of met platte schijven. De uitvinding voorziet in het gebruik van beide typen, en/of gelijkwaardige inrichtingen, bijvoorbeeld van een convex/concaaf type samengestelde maalschijven, in een methode voorzien door de uitvinding.

De uitvinding wordt verder toegelicht in het experimentele gedeelte van de beschrijving, zonder deze te beperken.

Experimentele gedeelte

In onderzoek is de vinding vergeleken met de traditionele techniek. Dit is gebeurd met behulp van een lab(oratorium)-protocol en met behulp van industriële apparatuur. Op basis hiervan kan de aard van de vezelfractie beoordeeld worden en kan de winbaarheid van inhoudsstoffen bij beide methodes vergeleken worden. Resultaten die hieronder getoond worden, illustreren het verschil in de winbaarheid van eiwit en andere inhoudsstoffen.

Traditionele werkwijze

In de experimenten op laboratorium schaal werd de traditionele werkwijze van malen en persen gesimuleerd door

- materiaal te verpulpen in een Tecator Homogenizer en de pulp uit te persen met behulp van een aangepaste trek-drukbank van Lloyd Instruments. Deze was voorzien van een beker met geperforeerde bodemplaat (oppervlak 50 cm²)
- 5 waarin 100 g verse pulp geperst werd bij een druk oplopend tot 10 bar, gedurende 15 minuten. Het oorspronkelijke materiaal en het uitgeperste sap werden geanalyseerd op stikstofgehalte en de winbaarheid van eiwit werd berekend als de hoeveelheid ruw-eiwit (hoeveelheid stikstof
- 10 vermenigvuldigd met 6.25) in sap uitgedrukt als percentage van de hoeveelheid ruw-eiwit in het oorspronkelijke materiaal.

- Op grotere schaal werd een hamermolen van het type Jenz
- 15 AZ30 ingezet om gras te desintegreren en werd de aldus verkregen grasulp uitgeperst in een Vetter schroefpers met een compressievoud van 1:7.65 en een perforatie van de cilinderwand van 0.7 mm. Door plantenmateriaal één of meerdere malen de hamermolen te laten passeren kon het
- 20 materiaal meer of minder ver gedesintegreerd worden.

Nieuwe werkwijze

- In de experimenten op laboratorium schaal werd de nieuwe werkwijze gesimuleerd door vers gras fijn hakselen in een
- 25 cutter, vervolgens 30 g fijn gehakselde gras stukjes met 400 ml water mengen en gedurende 10 minuten te vervezelen in een blender, de slurrie uit de blender te zeven op een 850 micron zeef, en de afgezeefde vezelfractie te wassen en te drogen. De vezel werd geanalyseerd op gehaltes aan
- 30 stikstof, as en celwanden en hiermee werd de samenstelling van de ontvezelde slurrie berekend. De vezelopbrengst werd bepaald als de hoeveelheid drogestof in de vezelfractie als percentage van de hoeveelheid drogestof in het uitgangsmateriaal. De winbaarheid van eiwit werd berekend

als de hoeveelheid ruw-eiwit in de ontvezelde slurrie uitgedrukt als percentage van de hoeveelheid ruw-eiwit in het oorspronkelijke materiaal.

- 5 Ook werd de nieuwe werkwijze beproefd met een Sprout-Waldron 12 inch drukrefiner, met maalschijven van het type D2A505. Het refinieren of vervezelen van vers gras vond plaats onder atmosferische omstandigheden bij een schijffafstand van 0.04 mm, onder toevoeging van water tot een
 - 10 consistentie van ca. 2% drogestof. De vezel werd vervolgens afgezeefd op een zeef met openingen van 140 micron.
- Resultaten van onderzoek:

Figuurbeschrijvingen

Figuur 1 en figuur 2 (detail)

Perskoek van gras (links) en grasvezel (rechts) afkomstig uit Engels Raaigras (*Lolium perenne*).

In de perskoek valt de groene kleur op als gevolg van de aanwezigheid van chloroplasten. Tevens zijn bladfragmenten herkenbaar aan hun grootte (doorsnede groter dan 1 mm) en de kenmerkende ribbels op de bovenzijde van het blad. De grasvezel onderscheidt zich door de lichte kleur (vrijwel complete afwezigheid van chloroplasten), de draadvormige structuur en de geringe diameter van de individuele vezels (in dit geval zeer veel kleiner dan 1 mm). De afstand tussen opeenvolgende cijfers is 1 cm.

15

Figuur 3

Suspensie van grasvezel uit Engels Raaigras (*Lolium perenne*).

20

Zichtbaar zijn vezelvormige structuren (vaatbundels) met een diameter van enkele tientallen micrometer en epidermisvellen met een kleinste diameter tot enkele honderden micrometer.

25

Figuur 4

Microscopische opname van epidermis in grasvezel afkomstig uit Engels Raaigras (*Lolium perenne*).

Kenmerkend is de aanwezigheid van huidmondjes bij Engels raaigras geconcentreerd in de epidermis van de bovenzijde van het blad. Het compactere weefsel terzijde van de huidmondjes is onderliggend sclerenchym. De langwerpige

30

epidermiscellen hebben een dwarsdoorsnede van ca. 20 micrometer.

Figuur 5

- 5 Microscopische opname van vaatbundels in grasvezel afkomstig uit Engels Raaigras (*Lolium perenne*).

Kenmerkend voor vaatbundels zijn de opbouw uit meerdere cellen en de aanwezigheid van vaten met netvormige verdikkingen. De diameter van de vezel in het midden van de
10 figuur bedraagt ca. 50 micrometer.

Figuur 6

- 15 Microscopische opname van parenchymcellen in de sapstroom van ontvezeld gras afkomstig uit Engels Raaigras (*Lolium perenne*). Deze sapstroom behoort bij de vezelfractie van figuren 1 en 2.

Kenmerkend voor parenchymcellen in grasbladeren is de overvloedige aanwezigheid van chloroplasten. Sommige parenchymcellen zijn echter kapotgegaan tijdens het fractioneren: alleen de celwand is nog zichtbaar, de chloroplasten komen geïsoleerd voor in de omringende vloeistof. De grootte van deze parenchymcellen bedraagt ca.
20 20 * 40 micrometer. De in deze figuur getoonde fractie is voor het fotograferen verdund om de relatief grote
25 hoeveelheid parenchymcellen in de sapstroom volgens de uitvinding tot uiting te laten komen.

Figuur 7

- 30 Microscopische opname van parenchymcellen in perssap van gras afkomstig uit Engels Raaigras (*Lolium perenne*). Dit perssap behoort bij de perskoek van figuren 1 en 2.

De in deze figuur getoonde fractie is voor het fotograferen geconcentreerd om de relatief kleine hoeveelheid parenchymcellen in het perssap tot uiting te laten komen.

5 Figuur 8

Processchema voor het vervezelen of refinieren van gras.

Figuur 9

Processchema voor het vervezelen of refinieren van gras.

10

Figuur 10

Processchema voor het vervezelen of refinieren van gras.

Vervezeling

Tabel 1. Vezelsamenstelling en vezelopbrengst van geteelde grassen, per soort en ras gemiddeld gedurende het seizoen,
5 en van enkele andere gewassen.

Soort/Ras	Stikstof- gehalte (g/kg ds**)	Asge- halte (g/kg ds)	Celwand gehalte (g/kg ds)	Vezelopbrengst % van drogestof in grondstof
Grassen				
<i>Lolium perenne</i> 4n Vr.*	4.0	50.6	867	28
<i>Lolium perenne</i> 2nVr.	4.3	43.5	865	34
<i>Lolium perenne</i> 4n Lt.	4.5	41.1	879	29
<i>Lolium perenne</i> 2n Lt.	5.4	34.7	857	29
<i>Lolium multiflorum</i> 4n	3.8	47.4	877	24
<i>Lolium multiflorum</i> 2n	4.4	36.6	880	27
<i>Phleum pratense</i>	4.3	39.8	862	30
<i>Festuca arundinacea</i>	4.4	36.7	867	29
<i>Dactylis glomerata</i>	5.1	42.0	873	32
<i>Festuca pratensis</i>	4.5	44.2	872	32

 Overige plantenmaterialen

Luzerne	5.7	18.9	824	28
Aardappelloof jong	4.2	26.1	836	16
Aardappelloof oud	3.7	50.7	714	21
Erwtenloof	4.8	25.7	832	29
Bietenloof	12.0	79.7	680	9

*) 4n en 2n: resp. tetraploid en diploid; Vr. en LT.: resp. vroeg- en laatbloeiend

5 **) ds: drogestof

Vervezelen van plantaardige biomassa levert een vezelfractie op die afhankelijk van de aard van het materiaal kan variëren van minder dan 10% tot meer dan 30% van de drogestof. Het exacte getal is ook afhankelijk van de maaswijdte van de zeef waarmee de vezel afgescheiden wordt en de intensiteit van wassen. De vezelfractie bestaat in het geval van *Lolium perenne* in de regel voor meer dan 80% uit celwandmateriaal en heeft een stikstofgehalte meestal lager dan 6-8 g per kg drogestof en een asgehalte meestal lager dan 50-100 g per kg drogestof.

Tabel 2. Samenstelling vezel

		refiner	lab-protocol
As		22.3	26.0
5	Stikstof (g/kg ds)	5.3	4.4
	Celwanden (g/kg ds)	808	792

De samenstelling van de vezelfractie is vergelijkbaar voor
 de experimenten met de refiner en de experimenten volgens
 10 het lab-protocol.

Ontvezeling

Tabel 3. Samenstelling van gras en van de ontvezelde
grasslurrie.

5

		Gras	Ontvezelde slurrie	
			refiner	lab-protocol
	As (g/kg ds)	92.6	138	139
10	Stikstof (g/kg ds)	31.0	47.4	48.7
	Celwanden (g/kg ds)	544	375	438

De ontvezelde slurrie bevat naast de celinhoudbestanddelen (zoals eiwit) ook een deel van de celwanden uit het
 15 plantenmateriaal. Dit zijn in hoofdzaak de celwanden uit het zachte parenchymatische weefsel die bij vervezelen desintegreren en vervolgens bij ontvezelen de zeef passeren als fijn gedispergeerd materiaal. De hoeveelheid aanwezig in de ontvezelde slurrie is mede-afhankelijk van de
 20 diameter van de zeefopeningen.

Tabel 4: Winbaarheid van ruw-eiwit uit geteelde grassen, per soort en ras gemiddeld gedurende het seizoen, en van enkele andere plantenmaterialen, bij malen+persen en bij ontvezelen.

5

Soort/Ras	Malen + persen (%)	Ontvezelen (%)
Grassen		
<i>Lolium perenne</i> 4n Vr.	30	95
<i>Lolium perenne</i> 2n Vr.	23	94
<i>Lolium perenne</i> 4n Lt.	22	95
<i>Lolium perenne</i> 2n Lt	16	94
<i>Lolium multiflorum</i> 4n	41	96
<i>Lolium multiflorum</i> 2n	35	95
<i>Phleum pratense</i>	11	94
<i>Festuca arundinacea</i>	21	94
<i>Dactylis glomerata</i>	31	93
<i>Festuca pratensis</i>	17	94
Overige materialen		
Luzerne	52	95
Aardappelloof jong	51	98
Aardappelloof oud	42	95
Erwtenloof	16	95
Bietenloof	24	95

10 Ontvezeling levert een slurrie die meestal meer dan 70%, en bij voorkeur meer dan 80% of 90% van alle ruw-eiwit uit het plantaardig materiaal bevat. Dit eiwit kan hieruit gewonnen worden door centrifugeren al dan niet voorafgegaan door hitte-coagulatie.

15 Bij de traditionele werkwijze van fractioneren bedraagt de winbaarheid van ruw-eiwit meestal minder dan 50%.

Tabel 5. Vergelijking van eiwitwinbaarheid uit gras bij herhaalde passage door hamermolen gevolgd door uitpersen in een schroefpers, en bij vervezelen volgens de uitvinding.

5

Eiwitwinbaarheid	
(%)	
Hamermolen +schroefpers	
10	Passages door hamermolen
	1x 28
	2x 30
	4x 35
15	8x 43
Vervezelen 93-96	
volgens de uitvinding	
20	Ook bij herhaald desintegreren van gras in een hamermolen gevolgd door uitpersen in een schroefpers bleek de eiwitwinbaarheid minder dan de helft van de eiwitwinbaarheid gemeten bij vervezelen van gras.

Processchema's voor het refinieren van ondergrondse delen van gewassen zoals knollen en wortels.

- 5 Gewassen suiker bieten worden in voorgehakselde of voorgesneden vorm gedoseerd in een refiner. Tijdens deze processgang wordt het knolweefsel vervezeld tot een pulp. Na de vervezeling stap wordt de vezelfractie van de sapstroom gescheiden bijvoorbeeld middels zeven, filtreren
- 10 of centrifugeren, en wordt de vaste fractie eventueel gewassen met water om de hierin nog oplosbare componenten te winnen. De vloeibare fractie of sapstroom wordt na centrifugatie verder verwerkt tot winning van de suikers op de wijze zoals gebruikelijk in de suikerindustrie.
- 15 (carbonatie, indikking, kristallisatie, centrifugatie, etc.) Door toepassing van de werkwijze volgens de uitvinding is de gangbare diffusie stap niet meer nodig. Niet 1100 liter water wordt gewonnen maar een reeds hoog geconcentreerde sapstroom is het resultaat. Behalve een directe
- 20 kostenbesparing als gevolg van eliminatie van de diffusie stap, zal ook de concentratie van het suiker in het serum of sapstroom hoger zijn dan die in stroom van de diffusie stap. Bovendien zal de eliminatie van de diffusie stap een besparing betekenen van de totale hoeveelheid benodigd water
- 25 met een inherente besparing aan verdampings en droogkosten. Door het volgen van een werkwijze volgens de uitvinding zal het suikerverlies (normaal circa 2%) sterk worden gereduceerd doordat de totale hoeveelheid aanwezige suiker in de biet in het serum blijft. Tevens is door de
- 30 vervezeling de vezelfractie van de suikerbiet beter verteerbaar dan de conventionele pulp, wanneer toegepast als ingrediënt van diervoeders.

Processchema's voor het refinieren van gewassen met voornamelijk blad- en/of stengeldelen zoals gras.

5 Voorbehandeling

- Bijgevoegde processchema's (zie figuren 8 tot 10) gaan uit van de aanvoer van gehakseld gras zoals dit ook gebruikelijk is bij de verwerking van gras en luzerne in
10 groenvoerdrogerijen. Normaliter ligt de haksellengte in de orde van grootte van enkele centimeters, maar deze kan ook langer of korter zijn. Voor de refiner-proef werd vers gras voorverkleind in een Pierret guillotinehakselaar op 6 mm deeltjeslengte, m.a.w. zeer kort. Vermoedelijk is zo'n
15 korte lengte niet noodzakelijk; refinieren of vervezelen van uitgeperst gras (met een deeltjeslengte van vermoedelijk enkele centimeters) leverde geen problemen op.

Wassen

- 20 Een wasstap zal waarschijnlijk in praktijk noodzakelijk zijn om zand te verwijderen en daarmee slijtage van apparatuur te verminderen en een schoner product te kunnen leveren. Deze wasstap kan mogelijk echter overgeslagen
25 worden als zand en andere verontreinigingen niet aanwezig zijn.

Sulfiettoevoeging

- 30 Toevoeging van sulfiet kan, maar hoeft niet, noodzakelijk zijn om ongewenste complexvorming tussen eiwitten en polyfenolen tegen te gaan. Op basis van ervaringen uit het verleden met de verwerking van grassap is bekend dat dergelijke complexvorming de nutritionele waarden van

graseiwitten vermindert. De omstandigheden tijdens refinieren kunnen echter anders zijn. Een snelle temperatuurstijging tijdens refinieren kan enzymatische activiteit acuut stoppen (blancheer-effect) en vorming van polyfenolen afremmen.

5

Refinieren: basisschema (fig. 8)

Refinieren van gras is in principe mogelijk met en zonder vloeistoftoevoeging tijdens het refinieren. In een eerste
10 proef verliep het proces met vers gras (15% drogestof) niet vlot zonder een royale bijmenging van water tot een drogestofpercentage van ca. 2%. De noodzaak van vloeistoftoevoeging is waarschijnlijk mede afhankelijk van refinier-type en aard van het gras (vezeligheid). Uitgeperst
15 gras (26% drogestof) kon zonder watertoevoeging gerefined worden. Of en zo ja hoeveel water bijgemengd wordt heeft gevolgen voor de temperatuurstijging tijdens refinieren, en dus voor de mate van eiwitdenaturatie en daarmee voor de vervolgstappen in het proces.

20

Het basisschema kent na refinieren de processtappen: uitzeven van de vezel, hitte-coaguleren van de refinervloeistof gevolgd door afscheiding van de eiwitkoek middels een decanter en indampen van de onteiwitte vloeistof.

25 Op dit basisschema zijn twee uiterste varianten denkbaar: één met een minimale toevoeging van vloeistof tijdens refinieren en één met een royale toevoeging van vloeistof. Het basisschema wordt dan gewijzigd tot resp. variant A (figuur 9) en variant B (figuur 10).

30

Refinieren: variant A (figuur 9)

Bij minimale toevoeging van retourvloeistof zal er mogelijk een flinke temperatuurstijging optreden tijdens refinieren: in

de proef met uitgeperst gras tot boven 70°C.

- Eiwitcoagulatie en pasteurisatie zullen dan tijdens het refinieren al optreden en mogelijk kan daardoor een aparte coagulatiestap overgeslagen worden. In dat geval wordt het
- 5 processchema vereenvoudigd tot refinieren - zeven - decanteren - indampen: zie variant A op basisschema.

Refinieren: variant B (figuur 10)

- 10 Variant B: Bij een royale toevoeging van retourvloeistof kan de temperatuurstijging tijdens refinieren beperkt blijven: in de proef met vers gras tot ca. 35° C. Daardoor zal vermoedelijk een deel van het eiwit in oplossing kunnen blijven. In dat geval zijn er na het refinieren twee
- 15 alternatieve routes denkbaar. De meest simpele is na uitzeven van de vezel de vloeistof hitte-coaguleren en decanteren. In dat geval ontstaat één eiwitkoek en een onteiwitte vloeistof die ingedampt kan worden (zie het basisschema). Een wat complexere route (variant B) is na
- 20 uitzeven van de vezel eerst decanteren waarbij een ruwe eiwitkoek gewonnen wordt (ruw, d.w.z. met bijmenging van fijn verdeelde parenchymatische celwanden die de zeef passeren), vervolgens hitte-coaguleren en opnieuw decanteren. Bij deze tweede decanteerstap wordt een
- 25 zuiverder eiwitkoek gewonnen.

Uitzeven van de vezels

- Voor het uitzeven van de vezels kunnen centrizeven ingezet
- 30 worden zoals bekend bij de vakman voor het afscheiden van aardappelvezel. In de proef werd een hellingzeef gebruikt bespannen met zeefgaas met openingen van 140 * 140 micron. Op lab-schaal werd een zeef met gaatjesdiameter van 850 en 250 micron toegepast. De ervaring hiermee is dat de meeste

vezels zich op een relatief grove zeef laten afscheiden. De fijnere vezelfractie kan toegevoegd worden aan de totale vezelfractie of via enzymatische vervloeiing aan de melasse, concentraat of sapstroom.

5

Wassen en drogen van vezel

De vezel die door zeven afgescheiden wordt, zal mogelijk verontreinigd zijn met opgeloste en gesuspendeerde stof.

- 10 Wassen met onteiwitte retourvloeistof is dan dus nodig, gevolgd door vochtverwijdering middels persen/centrifugeren en drogen.

Drogen eiwitkoek

15

De eiwitrijke koek die middels decanteren afgescheiden wordt, kan op dezelfde wijze gedroogd worden als bijvoorbeeld bekend aan de vakman voor aardappeleiwit. In geval van de aanwezigheid van een relatief hoge
20 lipidefractie is toevoeging van een antioxidant product verbeterend.

Indampen onteiwitte vloeistof

- 25 De onteiwitte vloeistof kan ingedampt worden tot een suikerrijke siroop.

Uitbreidingen procesgang

- 30 Het basisschema kan verder uitgebreid worden met processen die tot doel hebben de ruwe eiwitkoek verder te raffineren. Eén mogelijke toevoeging is enzymatische vervloeiing van de parenchymatische celwanden in de ruwe eiwitkoek. De suikers

die dit oplevert, kunnen bijvoorbeeld toegevoegd worden aan de melasse, concentraat of sapstroom.

CONCLUSIES

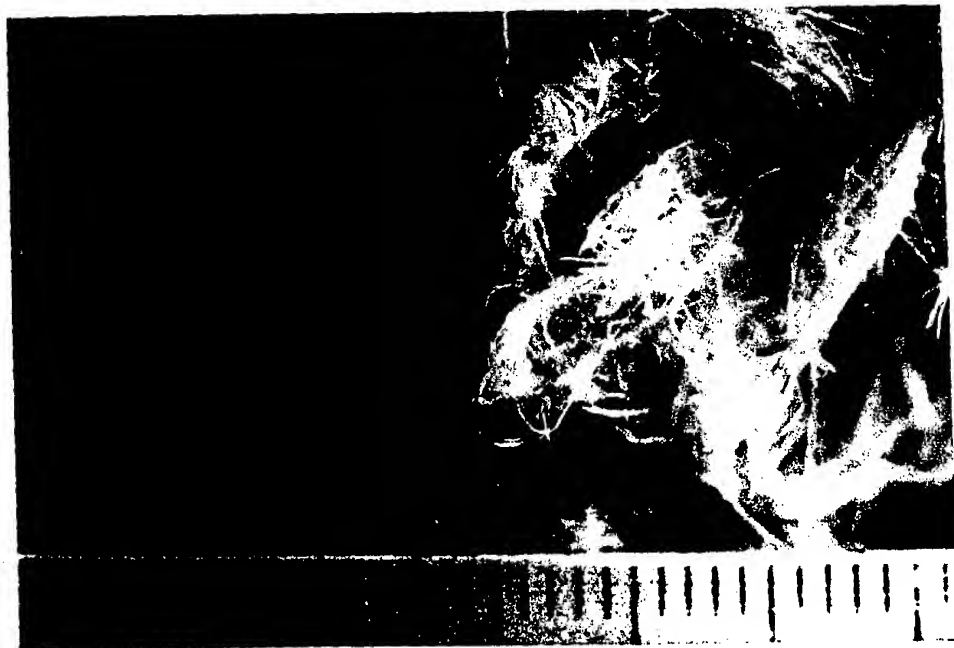
1. Werkwijze voor het scheiden van componenten uit plantaardig materiaal met het kenmerk dat het materiaal op zijn minst ten dele vervezeld wordt en vervolgens zodanig wordt gescheiden in een vezelfractie en een sapstroom dat
- 5 de vezelfractie voornamelijk relatief stevige weefsels zoals epidermis, sclerenchym en vaatbundels omvat en de sapstroom voornamelijk zachte weefsels zoals parenchym en cytosol omvat.
2. Werkwijze volgens conclusie 1 waarin de sapstroom
- 10 chloroplasten omvat.
3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2 waarin het materiaal mechanisch vervezeld wordt.
4. Werkwijze volgens conclusie 3 waarin het materiaal vervezeld wordt middels een refiner.
- 15 5. Werkwijze volgens een der conclusies 1-4 waarin de vezelfractie middels zeven wordt gescheiden van de sapstroom.
6. Werkwijze volgens een der conclusies 1-5 waarin het plantaardig materiaal afkomstig is van een genetisch
- 20 gemodificeerde plant.
7. Werkwijze volgens een der conclusies 1-6 waarin het plantaardig materiaal tenminste afkomstig is van ondergrondse delen, zoals wortels of knollen, van een plant.
- 25 8. Werkwijze volgens een der conclusies 1-7 waarin het plantaardig materiaal afkomstig is van een cultuurgewas.
9. Vezelfractie verkregen middels een werkwijze volgens een der conclusies 1-8.
10. Gebruik van een vezelfractie volgens conclusie 9.
- 30 11. Gebruik van een vezelfractie volgens conclusie 9 voor de productie van energie of voor de productie van karton en/of papier.

12. Sapstroom verkregen middels een werkwijze volgens een der conclusies 1-8.
13. Sapstroom volgens conclusie 12 welke meer dan 55%, bij voorkeur meer dan 75%, bij voorkeur meer dan 90% van het
5 ruw-eiwit van het plantaardige materiaal bevat.
14. Gebruik van een sapstroom volgens conclusie 12 of 13.
15. Gebruik van een sapstroom volgens conclusie 12 of 13 voor de productie van voedsel.
16. Gebruik van een sapstroom volgens conclusie 12 of 13
10 voor de winning of zuivering van tenminste een inhoudsstof.
17. Gebruik van een sapstroom volgens conclusie 16 voor de winning van een koolhydraat, zoals zetmeel of suiker.
18. Gebruik van een sapstroom volgens conclusie 12 of 13 voor de winning of zuivering van recombinante producten.
- 15 19. Inrichting voor toepassing van een werkwijze volgens een der conclusies 1-8.
20. Inrichting volgens conclusie 18 welke tenminste een refiner omvat.
21. Inrichting waarin een werkwijze volgens een der
20 conclusies 1-8 wordt toegepast.

Figuur 1



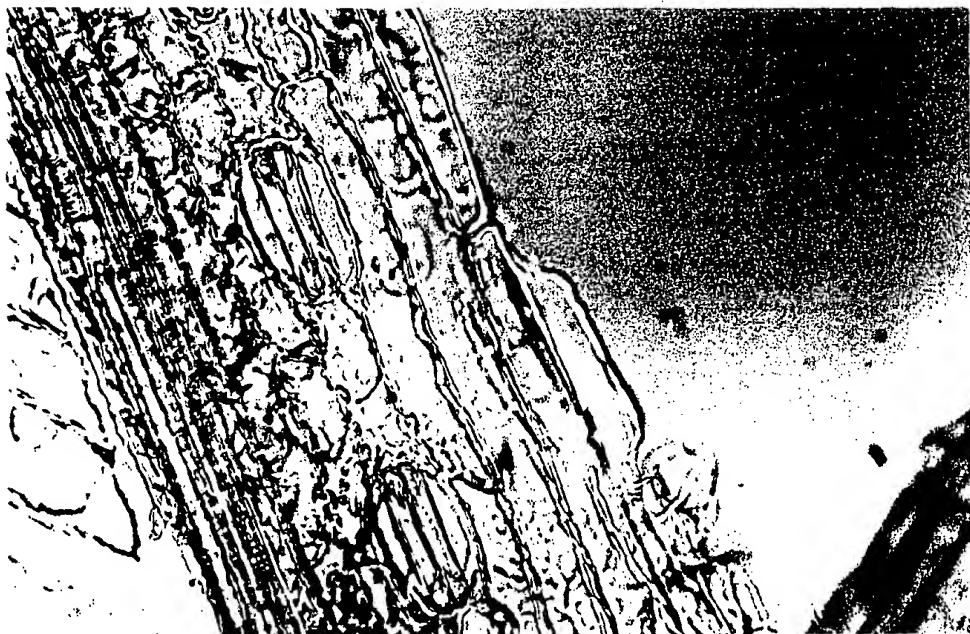
Figuur 2



10 III A



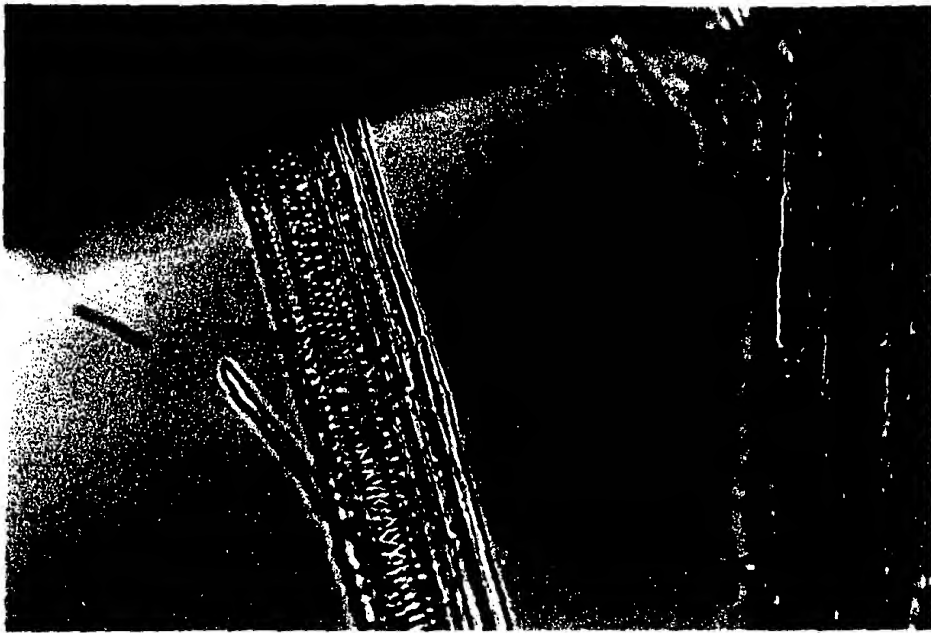
Figuur 4



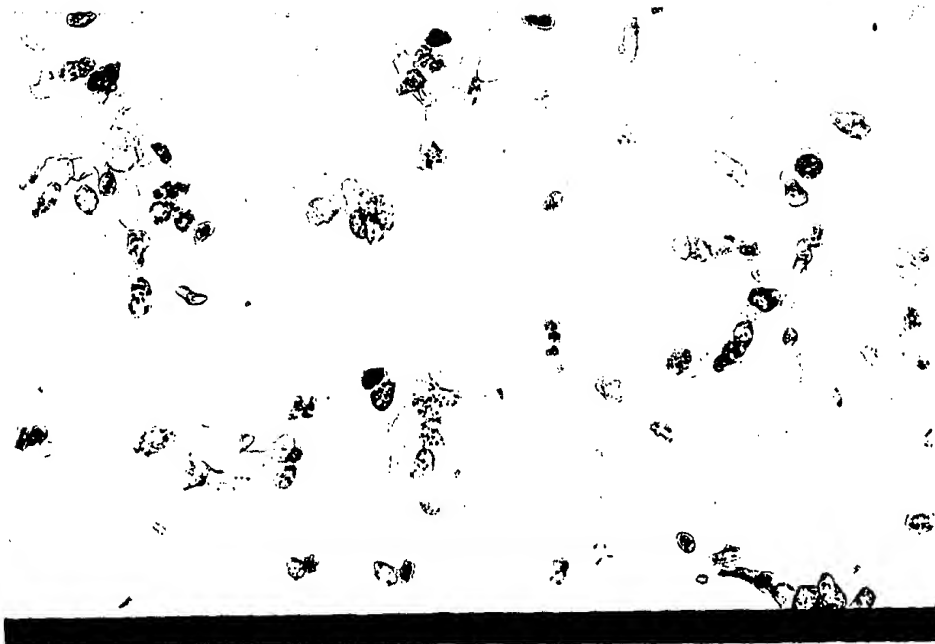
10 III B

Figuur 5

10 10 976

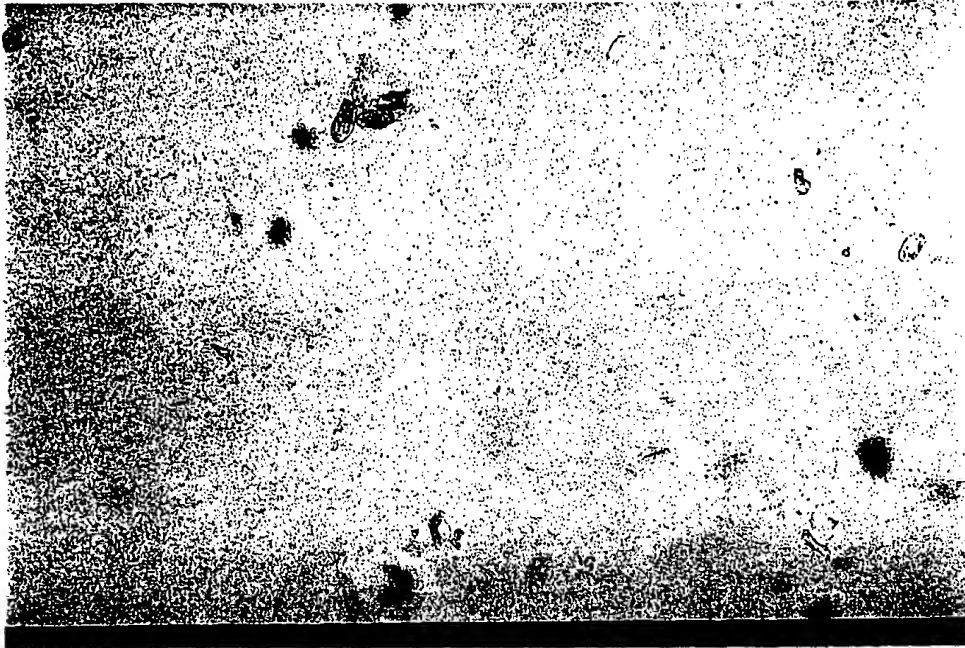


Figuur 6



11. III C

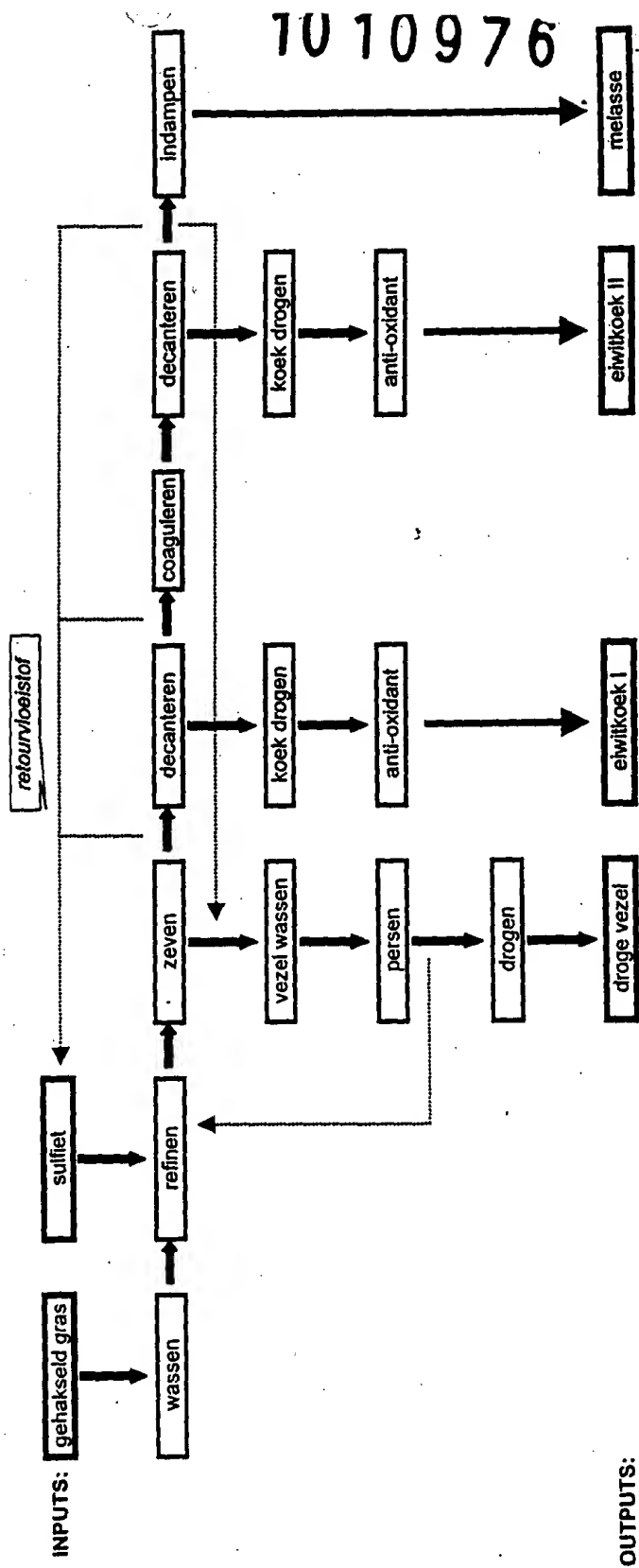
Figuur 7



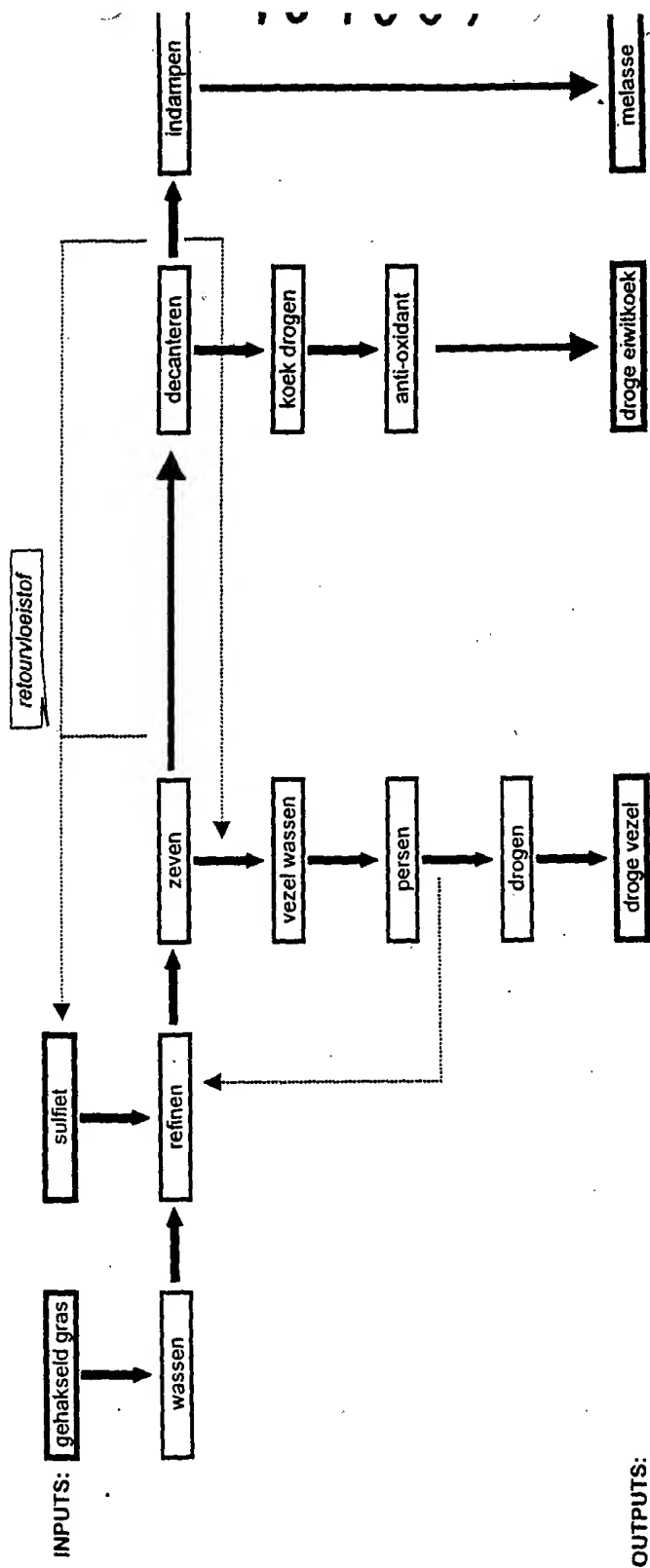
p. III D

111 E

Figuur 10



Figuur 9



U G

Figuur 8

